

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15713

研究課題名（和文）WT1遺伝子変異によるFrasier症候群の病態解明および新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenicity and development of new treatment for Frasier syndrome

研究代表者

長野 智那（Nagano, China）

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：60814316

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Frasier症候群は晩発性で緩徐に進行する腎障害、男性性分化異常およびWilms腫瘍や性腺腫瘍の発症を特徴とする症候群であり、現在まで特異的治療法は存在しない。そのため本研究で、日本人におけるFrasier症候群の発症頻度を明らかにし、臨床的特徴について変異の部位による表現型の相関について検討した。また、アンチセンス治療薬を用いた新しい治療法の開発を目指し実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、Frasier症候群に関して、性分化異常やWilms腫瘍の発症頻度など臨床的特徴に関する検討は海外においていくつか報告されているが、そのスプライシング異常に注目した発症機序の解明および治療法の開発に関しては、これまで一切検討されてこなかった。今回の研究においては、近年大変注目されており、また私たちの研究室でその研究の専門的知識と技術が確立しているアンチセンス治療薬を用いた新規治療法の開発であり、Frasier症候群における腎症状の進行抑制を来すことが出来る画期的な研究である。

研究成果の概要（英文）：Frasier's syndrome is characterized by slowly progressive glomerulopathy, pseudohermaphroditism and Wilms' and gonadal tumors. There is no specific treatment exists until now.

Therefore, in this study, we determined the incidence of Frasier syndrome in Japanese, and examined the genotype-phenotype correlation according to the variant. We also conducted experiments to develop new treatments using antisense drugs.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：Frasier症候群 WT1 スプライシング アンチセンス治療薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

*WT1* 遺伝子は Wilms 腫瘍の原因遺伝子として単離された遺伝子であり、泌尿生殖系の発生分化や性分化を制御することが明らかになっている。この遺伝子産物 (Wilms Tumor 1) は C 末端側に 4 個の zinc finger domain (Zf) を有する転写因子であり、Wild type の *WT1* 遺伝子からはエクソン 9 の 3' 側の 9 塩基が含まれるものと含まれないものの 2 種類のトランスクリプトのアイソフォームが産生される。これら 9 塩基はリジン (K)、スレオニン (T)、セリン (S) の 3 アミノ酸をコードしているため、これら二つのアイソフォームはそれぞれ、+KTS、-KTS と呼ばれる。

一方、Frasier 症候群は腎障害、男性性分化異常、Wilms 腫瘍や性腺腫瘍の発症を特徴とし、腎障害においては、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 (SRNS) で発症し、緩徐に進行し、10 代後半で腎不全へと進行することを特徴とする。イントロン 9 のスプライシングドナーサイト (IVS+1 から +6) の点変異によるスプライシング異常のため +KTS 産物の産生量が大幅に減少することで発症することも判明している。常染色体優性遺伝形式をとるが大部分は孤発例であり、正確な発症頻度は知られていない。

近年、私たちは次世代シーケンサー (NGS) による網羅的遺伝性腎診断体制を確立し、SRNS においても遺伝学的検査を行っている。その依頼件数は平成 28 年度で 52 検体、平成 29 年度は 9 月末までで 55 検体で、これまで解析が終了した 107 例中 7 例に *WT1* 遺伝子の異常を同定した。さらにそのうち 2 例で Frasier 症候群と診断している。このように比較的稀な疾患であるが、今後、遺伝学的検査体制の整備により、新規の患者が次々と発見されることが予想され、その病態解明および新規治療法の開発が強く望まれる。

近年、アンチセンス治療薬が注目されており、同薬剤によりスプライシングパターンを変更する治療法が次々と開発されている。2016 年にはアメリカ FDA において、デュシャンヌ型筋ジストロフィーおよび脊髄性筋萎縮症患者に対するアンチセンス治療薬の投与が承認された。

本研究では日本人における Frasier 症候群の発症頻度、臨床的特徴を明らかにすると共に、in vivo および in vitro 実験系を駆使し、Frasier 症候群の病態解明およびアンチセンス治療薬を用いた新規疾患特異的治療法の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

遺伝性腎疾患の中で、Frasier 症候群を認める発症頻度やスプライスサイトの変異部位 (IVS9+1 から 6) の違いによる表現型の違いを明らかにするとともに新規疾患特異的治療法の開発を目指す。以下のように研究を進めていく。

- (1)、NGS を用いた SRNS に対する網羅的診断体制により、新規 Frasier 症候群患者の発掘を行う。さらにその発症頻度、臨床的特徴、遺伝子型-表現型の相関について詳細に検討する。
- (2)、*WT1* 遺伝子エクソン 9 を含んだ minigene construct を作成する。さらに mutagenesis により既報の *WT1* 遺伝子イントロン 9 の変異を挿入し、その後、培養細胞にトランスフェクトし、mRNA を強制発現させる。それにより、各遺伝子変異におけるスプライシング異常発症メカニズムの解明を行う。また同時に患者尿中落下細胞より抽出した患者腎由来細胞を用いた培養細胞を作成し、同様の検討を行う。
- (3)、IVS9+4 から 6 に変異を有するものを治療対象とし、作成した minigene construct および患者腎由来培養細胞に対し、アンチセンス治療薬を投与することで、-KTS スプライシング産物の産生を抑制し、+KTS 産生量を増加させることを証明する。
- (4)、Crisper-Cas9 システムを用い、IVS9+4 から 6 に変異を有するモデルマウスを作成し、アンチセンス治療薬の臨床的有効性の評価を行う。

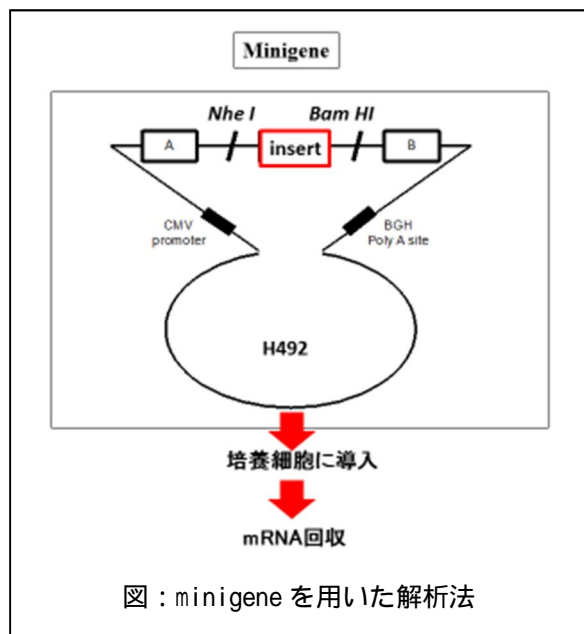
### 3. 研究の方法

NGS を用いた SRNS に対する網羅的診断体制により、新規 Frasier 症候群患者の発掘を行う。さらにその発症頻度、臨床的特徴、遺伝子型-表現型の相関について詳細に検討する。

(1), 遺伝性腎疾患における Frasier 症候群の発症頻度を解明するためには、全国から遺伝性腎疾患の症例を集め遺伝学的検査を行い診断する必要がある。そのためには、関連学会において当研究室における取り組みを周知し、今後も全国から広く解析依頼を受け診断数を増やしていく予定である。

(2), 各遺伝子変異におけるスプライシング異常発症メカニズムの解明を行う。

Frasier 症候群は *WT1* 遺伝子 IVS9+1 から 6 のスプライスサイトの変異であるため、実際にその変異によりスプライシング異常が生じるかどうかを minigene construct を作成し証明する。Mutagenesis により既報の *WT1* 遺伝子イントロン 9 の変異を挿入した minigene construct を作成し、これらを培養細胞にトランスフェクションし、mRNA を強制発現させて解析を行う(図)。これによりトランスクリプトにおける+KTS と-KTS の比率を測定するなど、詳細な疾患発症メカニズムを明らかとする。



(3), 作成した minigene construct および患者腎

由来尿中落下細胞に対し、アンチセンス治療薬を投与し、-KTS スプライシング産物の産生を抑制する。それにより新規治療薬の有効性の評価を行う。

アンチセンス治療薬により、-KTS 産物を減少させ、+KTS 産物を増加させることにより治療を行う。

(4), 動物モデルの作成を行い、アンチセンス治療薬の効果を判定する。

Crisper-Cas9 システムにより、IVS+4 から 6 の変異を有するマウスモデルを作成し治療効果を検討する。

### 4. 研究成果

(1), 次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子腎診断体制を確立し、平成 26 年の開始時から SRNS における依頼検体は令和 2 年 2 月の時点で 326 検体に達した。遺伝子変異を有する症例の中で、*WT1* 遺伝子変異を有する症例が最多で 23 検体であった。また、そのうち 9 例で Frasier 症候群と診断し、変異の部位は 6 例が IVS9+4 の変異、3 例が IVS9+5 の変異であり明らかな臨床症状の差は認められなかった。

(2), Frasier 症候群において、変異の部位ごとのスプライシング異常発生メカニズムの解明を行うため *WT1* 遺伝子エクソン 9 を含んだ minigene construct を作成した。この minigene construct を使用し、mutagenesis により既報の *WT1* 遺伝子イントロン 9 の変異を挿入した。その後、培養細胞にトランスフェクトし、mRNA を強制発現させる実験を行った。結果は、正常配列を導入した細胞からは正常トランスクリプトおよび-KTSmRNA の両方が検出されたが、各変異を導入した細胞からはすべて-KTSmRNA のみが検出された。変異の部位による-KTSmRNA 発現パターンの変化は見られなかった。既報の Frasier 症候群における遺伝子変異の部位による臨床的重症度に差は見られず、今回の in vitro での解析は臨床での表現型を裏付ける結果となった。

(3), 現在、治療法の開発として+KTS スプライシング産物の増加を目指し KTS のバランスが補正することが治療に応用出来るのではないかと考えている。そのため、+KTSmRNA の増加を期待しアンチセンス治療薬を minigene construct や尿中落下細胞に投与し確認している。現時点で 32 種類のアンチセンス治療薬を検証済みであり、いくつかで+KTSmRNA の増加を認めている。

(4), マウスとヒトでは *WT1* 遺伝子 Exon9 周辺の配列は、ほぼ同じであるため Fraiser 症候群マウスを作製し、今後は in vivo で有効であったアンチセンス治療薬をマウスモデルで試し、臨床への応用へとつなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>China Nagano, Tomohiko Yamamura, Tomoko Horinouchi, Yuya Aoto, Shinya Ishiko, Nana Sakakibara, Yuko Shima, Koichi Nakanishi, Hiroaki Nagase, Kazumoto Iijima, Kandai Nozu | 4. 巻<br>10        |
| 2. 論文標題<br>Comprehensive Genetic Diagnosis of Japanese Patients With Severe Proteinuria   | 5. 発行年<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>270 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-019-57149-5.  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-         |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>辻 ゆり佳  |
| 2. 発表標題<br>in vitro splicing assayを用いたFrasier症候群の臨床遺伝学的検討 |
| 3. 学会等名<br>第53回 日本小児腎臓病学会学術集会                             |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>長野 智那                   |
| 2. 発表標題<br>遺伝性ネフローゼ症候群における臨床的特徴の検討 |
| 3. 学会等名<br>第54回日本小児腎臓病学会学術集会       |
| 4. 発表年<br>2019年                    |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>長野 智那                   |
| 2. 発表標題<br>遺伝性ネフローゼ症候群における臨床的特徴の検討 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本腎臓学会学術集会          |
| 4. 発表年<br>2019年                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>長野 智那  |
| 2. 発表標題<br>Comprehensive genetic diagnosis system for steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese population |
| 3. 学会等名<br>International Pediatric Nephrology Association 2019  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 飯島 一誠<br><br>(Iijima Kazumoto) |                       |    |
| 研究協力者 | 野津 寛大<br><br>(Nozu Kandai)     |                       |    |